

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“EVALUACIÓN DE TRES PROGRAMAS DE
VACUNACIÓN CONTRA LARINGOTRAQUEITIS
INFECCIOSA AVIAR USANDO DOS VACUNAS
VECTORIZADAS EN POLLOS DE CARNE”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Silvia Rocío Charca Padilla

Lima – Perú

2013

DEDICATORIAS

A Jesús y la Virgen María por su amor

A la familia Charca Padilla

por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jesús y la virgen María por sus bendiciones inagotables.

Doy gracias a mis padres y hermanos por ser la FAMILIA que tanto quiero.

Agradezco infinitamente a la Dra. Eliana Icochea por haberme transmitido sus conocimientos y experiencias, así mismo por su constante y paciente dedicación, compartiendo su tiempo de manera generosa para la realización de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer también a los doctores Rosa Perales, Rosa Gonzáles, Pablo Reyna, John Guzmán, Nelly Cribillero y Viviana San Martín por sus enseñanzas y consejos.

A mis amigos por su gran amistad y solidaridad, especialmente a: Julia Palián, Katherine Porturas, Evelin Saenz, Rober Rojas, Cecilia Pérez, Giulianna Forno, Karen Segovia, Max Jiménez, Deisy Hassinger, Hypatia Fernández, Rosario Condori, Juan Calcina, Gianfranco Arroyo, Juan More, Raúl Michue, Lupe López, Juan Salazar, Víctor Roca, Amalia Mayanga y Alicia Herencia.

A mi querida tía Irene Charca y mi muy estimado primo Giancarlo Ayala, por irradiarme su espíritu de perseverancia.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. HISTORIA.....	3
2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA	4
2.3. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS	4
2.3.1. Etiología y clasificación taxonómica.....	4
2.3.2. Características morfológicas.....	5
2.3.3. Composición química	5
2.3.4. Replicación viral.....	6
2.3.5. Patogénesis y latencia	6
2.3.6. Supervivencia e inactivación del virus	7

2.3.7. Clasificación de las cepas	8
2.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2.4.1. Incidencia y distribución geográfica de la laringotraqueítis infecciosa aviar.....	8
2.4.2. Hospederos	9
2.4.3. Transmisión	9
2.5. INMUNIDAD.....	10
2.6. SIGNOS.....	10
2.7. DIAGNÓSTICO	11
2.7.1. Serología.....	12
2.7.2. Histopatología.....	13
2.7.3. Necropsia	14
2.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	15
2.9. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD	15
2.9.1. Bioseguridad.....	15
2.9.2. Vacunas	17
2.9.2.1. Vacunas a virus vivo modificado.....	17
2.9.2.2. Vacunas recombinantes	18
2.9.2.3. Vacunas inactivadas.....	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. LUGAR DE ESTUDIO	21
3.2. MATERIALES	21
3.2.1. Animales	21
3.3. MÉTODOS	21
3.3.1. Tamaño muestral	21
3.3.2. Diseño experimental	23
3.4. PARÁMETROS EVALUADOS	24
3.4.1. Mortalidad	24
3.4.2. Signos clínicos	24
3.4.3. Lesiones macroscópicas	26
3.4.4. Lesiones histopatológicas	26
3.4.5. Respuesta serológica	28
3.4.6. Parámetros productivos	28
3.5. ANÁLISIS DE DATOS	29
IV. RESULTADOS	30
4.1. EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD	30
4.2. EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS	31
4.2.1. Evaluación de los signos respiratorios	31

4.2.2. Evaluación de la conjuntivitis.....	33
4.2.3. Evaluación de la depresión	35
4.3. EVALUACIÓN DE LAS LESIONES MACROSCÓPICAS EN TRÁQUEA	35
4.4. EVALUACIÓN DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN TRÁQUEA.....	37
4.5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA SEROLÓGICA	40
4.6. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS.....	41
4.6.1. Evaluación del peso corporal.....	41
4.6.2. Evaluación del índice de conversión alimenticia (ICA)	42
4.6.3. Evaluación del índice de eficiencia productivo europeo (IEPE)	42
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. LITERATURA CITADA	49
VIII. ANEXOS.....	57

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la protección conferida por tres programas de vacunación contra Laringotraqueítis infecciosa (LTI) en pollos de engorde usando dos vacunas comerciales recombinantes. Se utilizaron 288 pollos machos de la línea Ross 308 de 1 día de edad, que fueron distribuidos en cuatro grupos de 72 animales con tres repeticiones de 24 aves por grupo. El grupo A fue vacunado al primer día de edad por vía subcutánea con la vacuna recombinante comercial del virus de viruela aviar que expresa el gen de la glicoproteína B del virus de laringotraqueítis infecciosa aviar (VLTi), el grupo B fue vacunado simultáneamente al día 14 con una vacuna inactivada por vía subcutánea más una vacuna recombinante comercial del virus de viruela aviar que expresa el gen de la glicoproteína B del VLTi aplicada por punción alar, el grupo C fue vacunado al día 1 de edad por vía subcutánea con una vacuna recombinante comercial de herpesvirus de pavo (HVT) asociado a células que expresa los genes de las glicoproteínas I y D del VLTi y, el grupo D no fue vacunado. A los 35 días de edad todas las aves fueron desafiadas con una cepa del VLTi con un título de 10^7 DIE₅₀. Post desafío las aves sin vacuna presentaron mayor severidad de signos respiratorios que las vacunadas ($p < 0.05$), observándose una tendencia en el grupo C a presentar menor grado de signos respiratorios y conjuntivitis. Las lesiones histopatológicas variaron entre grupos, siendo el grupo C el que tuvo la más rápida recuperación. Los parámetros productivos (peso corporal, índice de conversión alimenticia e índice de eficiencia productivo europeo) no mostraron diferencias ($p > 0.05$) entre grupos, sin embargo el grupo C mostró una mejor tendencia respecto de los demás grupos. Las dos vacunas vectorizadas indujeron una protección parcial contra la enfermedad, obteniéndose la mejor protección contra Laringotraqueítis en las aves vacunadas con la vacuna recombinante HVT que expresa los genes de las glicoproteínas I y D del VLTi.

Palabras claves: Laringotraqueítis, vacunación, recombinante

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the protection of three immunization programs against infectious laryngotracheitis (ILT) in broilers using two recombinant commercial vaccines. There were used 288 1-day-old Ross-308-line male birds distributed in four experimental groups of 72 animals with three replicates of 24 birds per group. The group A was vaccinated at one day old by subcutaneous route with a commercial recombinant fowlpox virus (FPV)-vectored vaccine expressing ILT virus (ILTV) glycoprotein B gene. The group B was simultaneously vaccinated at day 14 with an inactivated vaccine by subcutaneous route and commercial recombinant fowlpox virus vectored vaccine expressing ILTV glycoprotein B gene applied via wing web. The group C was vaccinated at one day old by subcutaneous route with HVT recombinant commercial vaccine expressing genes encoding for ILTV glycoproteins I and D. The group D was unvaccinated. At 35 days old all birds were challenged with ILTV pathogenic strain with 10^7 DIE₅₀. Post challenge birds without vaccine showed higher degree of respiratory signs than the vaccinated ones ($p < 0.05$), with a trend in the birds of group C to present less degree of respiratory signs and conjunctivitis. Microscopic lesions were variable among groups, but the group C presented a faster recovery. Production parameters (body weight, feed conversion index, and European productive efficiency index) showed no difference ($p > 0.05$) among groups; however, the group C showed a better trend compared to other groups. In this study the best protection against laryngotracheitis was obtained in birds vaccinated with HVT recombinant vaccine expressing ILTV glycoproteins I and D.

Key words: laryngotracheitis, vaccination, recombinant

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad semanal acumulada hasta los 49 días de edad de las aves.....	30
Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad post desafío hasta los 49 días de edad de las aves	31
Cuadro 3. Grado de signos respiratorios post desafío	32
Cuadro 4. Número de aves con signos respiratorios post desafío	32
Cuadro 5. Grado de conjuntivitis post desafío	34
Cuadro 6. Número de aves con conjuntivitis post desafío	34
Cuadro 7. Grado de depresión post desafío.....	35
Cuadro 8. Número de aves con depresión post desafío.....	35
Cuadro 9. Grado de hemorragias petequiales en tráquea post desafío	36
Cuadro 10. Grado de sangre en lumen traqueal post desafío	36
Cuadro 11. Grado de mucosidad traqueal post desafío	36
Cuadro 12. Grado de lesiones histopatológicas en tráquea post desafío	38
Cuadro 13. Resultados serológicos de las aves antes del desafío (35 días de edad) y 15 días posteriores al desafío (50 días de edad).....	40

Cuadro 14. Peso corporal promedio (gramos) por semana	41
Cuadro 15. Ganancia de peso (gramos) post desafío	42
Cuadro 16. Índice de conversión alimenticia (ICA) post desafío	42
Cuadro 17. Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE) a los 14 días	
post desafío	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Grado promedio de signos respiratorios post desafío	33
Figura 2. Grado promedio de conjuntivitis post desafío.....	34
Figura 3. Hemorragias petequiales en tráqueas de los grupos A, B, C y D.....	37
Figura 4. Grado promedio de lesiones histopatológicas en tráquea post desafío	38
Figura 5. Imágenes de lesiones histopatológicas traqueales de grado 2 y 3.....	39

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Hemorragias petequiales en tráquea post desafío	57
Anexo 2. Lesiones histopatológicas en tráquea post desafío.....	58

I. INTRODUCCIÓN

La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) es causada por el herpesvirus tipo 1 de las aves que afecta el tracto respiratorio alto. Entre los signos clínicos causados por la enfermedad se incluyen conjuntivitis, descarga nasal, estornudos, ronquera, disnea y depresión, los cuales pueden variar desde muy severos, con alta mortalidad por asfixia debido al exudado fibrino-hemorrágico presente en el lumen de la tráquea (Sellers *et al.*, 2004), a una forma muy leve, no diferenciable de otras enfermedades respiratorias de pollos, denominada “Laringotraqueítis silenciosa”. El órgano blanco del virus es la tráquea (Ou y Giambrone, 2012).

A partir de 1996, como consecuencia de informes serológicos negativos emitidos por diversos laboratorios de diagnóstico, el Perú fue considerado por la OIE como país libre de LTI (Yauris, 2005), sin embargo el 11 de agosto del 2008 el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV – UNMSM) reportó al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) un caso con sintomatología clínica similar a LTI en una parvada de gallos de pelea, siendo finalmente confirmada la enfermedad por histopatología, aislamiento viral y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Negrete, 2008). Debido a ello se implementaron medidas para el control de la enfermedad, entre ellas la inmunización mediante el uso de vacunas recombinantes (vectorizadas) e inactivadas; prohibiéndose el empleo de vacunas a virus vivo modificado, por las autoridades del Ministerio de Agricultura del Perú, puesto que estas vacunas pueden revertir a virulencia, tal como ha sido señalado por Guy y García (2008), quienes indican que las vacunas a virus vivo modificado establecen infecciones latentes y pueden revertir a virulencia ocasionando brotes de la enfermedad.

En nuestro país existen pocos estudios de evaluación de la protección, conferida por vacunas recombinantes e inactivadas, aplicadas ya sea individualmente o en combinación, en pollos de engorde. El objetivo de la presente investigación fue comparar en pollos de engorde la protección conferida por tres programas de vacunación contra LTI usando vacunas vectorizadas, mediante la evaluación de la mortalidad, signos clínicos, lesiones macroscópicas, lesiones histopatológicas, respuesta serológica y parámetros productivos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTORIA

La primera descripción de LTI fue en 1925 en donde se describe un brote en gallinas de traspatio en el estado de Rhode Island en los Estados Unidos. Debido a la falta de caracterización de los distintos agentes patógenos en las primeras décadas del siglo pasado, la enfermedad recibió muchos nombres, como laringotraqueítis, laringotraqueítis infecciosa, bronquitis infecciosa y difteria aviar. En consecuencia, en 1931 se adoptó la denominación de laringotraqueítis infecciosa por el comité especial de enfermedades aviares de la asociación de médicos veterinarios americanos “The Special Committee on Poultry Diseases of the American Veterinary Medical Association”. LTI fue la primera enfermedad viral de importancia para la que se desarrolló una vacuna eficaz y disponible comercialmente (Guy y García, 2008).

El VLTI ha causado brotes en muchos países del mundo (Hidalgo, 2003), sin embargo desde 1996 la OIE había declarado al Perú, como país libre de Laringotraqueítis Infecciosa Aviar (LTI), basándose en informes serológicos negativos emitidos por diversos laboratorios de diagnóstico (Yauris, 2005). No obstante, el 11 de Agosto del 2008, el Laboratorio de Patología Aviar de la FMV - UNMSM reporta al SENASA un caso sospechoso de LTI en gallos de pelea con serología positiva, posteriormente este reporte fue confirmado por histopatología y aislamiento viral a partir de inoculación en embriones al tercer pasaje, en el laboratorio FARVET en Chíncha (SENASA, 2008).

Desde que se confirmó la presencia de esta enfermedad en nuestro país, su control se ha basado en estrictas medidas de bioseguridad y vacunación con vacunas recombinantes (vectorizadas) e inactivadas.

2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA

La importancia de la laringotraqueítis infecciosa aviar radica en el impacto económico negativo que ocasiona en la industria avícola y en la economía nacional, debido a la elevada mortalidad, morbilidad, retardo en el crecimiento en pollos de carne e infecciones secundarias (Humberd *et al.*, 2002), además de gastos por tratamientos (Alvarado, 2010). LTI también es un obstáculo para la exportación de productos y subproductos avícolas a países libres de LTI. Cabe señalar que la clasificación de la laringotraqueítis infecciosa forma parte de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la oficina internacional de epizootias (OIE), ello significa que la enfermedad es de notificación obligatoria (OIE, 2013).

2.3. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

2.3.1. Etiología y clasificación taxonómica

El virus de laringotraqueítis infecciosa es clasificado como un miembro de la familia *Herpesviridae*, en la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, taxonómicamente es identificado como un *Gallid herpesvirus I* (Guy y García, 2008).

El virus de laringotraqueítis infecciosa (VLTI) es un virus estable, sin embargo con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares se han identificado nueve genotipos (clase 1 hasta la clase 9) probablemente dos de estos (clase 8 y 9) han sido generados por el uso de una vacuna viva recientemente empleada en Australia (vacuna Nobilis ILT, Intervet Pty Ltd) (Blacker *et al.*, 2011).

2.3.2. Características morfológicas

El VLTII es un virus ADN, el ADN se encuentra dentro una cápside icosaédrica, externamente está envuelto por una bicapa lipídica (envoltura), en su superficie se hallan espículas de glicoproteína viral. La partícula viral completa tiene un diámetro de 195 a 250nm. (Fuchs *et al.*, 2007; Guy y García, 2008).

2.3.3. Composición química

El genoma del VLTII está compuesto por ADN bicatenario lineal de 148 kilopares de bases (kpb) que consta de una región única larga (UL) y una única región corta (US) (Guy y García, 2008), la cual tiene secuencias de repeticiones invertidas en cada flanco. Similares estructuras, que permiten la formación de dos genomas isoméricos con diferente orientación de la región corta, son también halladas en muchos otros alfa herpesvirus y han sido clasificados como genomas de herpesvirus tipo D (Fuchs *et al.*, 2007).

El ADN tiene una densidad de 17704g/mL, similar a otros herpesvirus, con una relación de guanina y citosina con respecto al genoma de 45%, el cual es más bajo que muchos otros herpesvirus de animales (Hidalgo, 2003).

Las glicoproteínas del virus son responsables de la estimulación humoral y la respuesta inmune mediada por células (Hidalgo, 2003). Se ha reportado que las glicoproteínas B, D, H, K, y L (gB, gD, gH, gK, gL) son esenciales para la replicación viral, al igual que la glicoproteína E (gE) y la glicoproteína I (gI) (Chang *et al.*, 2002). La ausencia de la glicoproteína G (gG) permitió una marcada atenuación de la virulencia, mientras que la eliminación de la glicoproteína J (gJ) redujo importantemente la patogenicidad del virus (Fuchs *et al.*, 2007).

2.3.4. Replicación viral

El virus inicia la infección mediante la adherencia a los receptores celulares y la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped, seguidamente la nucleocápside viral se libera en el citoplasma y se transporta hacia la membrana del núcleo; posteriormente el ADN viral es liberado y migra al núcleo a través de los poros nucleares. Dentro se produce la transcripción y replicación del ADN viral (Chacón, 2005).

La replicación del ADN viral se desarrolla por medio de un mecanismo en círculo, con la formación de concatémeros. Los concatémeros de ADN se desdoblan en unidades monoméricas y son empacados dentro de nucleocápsides preformadas en el núcleo celular. Las nucleocápsides, una vez empacadas con el ADN viral, adquieren una envoltura al migrar por las láminas internas de la membrana nuclear. Entonces, las partículas envueltas migran a través del retículo endoplasmático y se acumulan en las vacuolas del citoplasma (Guy y García, 2008). Los viriones envueltos se liberan de la membrana vacuolar mediante lisis celular o por fusión de la membrana vacuolar y exocitosis (Rodríguez, 2007).

2.3.5. Patogénesis y latencia

La edad más común de infección en el pollo de engorde es a partir de la cuarta semana de edad (Kerr, 2010). El virus ingresa vía respiratoria o por la conjuntiva e inicia su replicación en el epitelio de la laringe, tráquea y conjuntiva (Guy y García, 2008). Los tejidos “diana” del virus son la tráquea y la laringe; aunque también pueden infectarse los senos paranasales, sacos aéreos y tejido pulmonar (Bagust y Johnson, 1995). Ello dependerá también de complicaciones con bacterias secundarias porque el virus de la laringotraqueítis es básicamente una enfermedad del sistema respiratorio superior sin que participen los pulmones y sacos aéreos (Dufour- Zavala y Zavala, 2008). No existe evidencia clara de que el VLTi haga viremia (Guy y García, 2008).

La replicación activa del virus ocurre durante los siete primeros días de la infección (Bagust y Johnson, 1995) y la eliminación viral suele estar acompañada por degeneración y necrosis del epitelio de tráquea y laringe, llegando a exponer y lesionar los vasos sanguíneos ocasionando hemorragias en el epitelio afectado (Gibert, 2010). En consecuencia, la reacción inflamatoria a nivel del tracto respiratorio alto puede ser clasificada como catarral o fibrinohemorrágica (Salas, 2010). Posterior a la excreción viral activa, se establece una fase de infección latente que comienza entre los 7 a 10 días post infección (Bagust y Johnson, 1995), la cual sucede en los tejidos respiratorios (Coppo *et al.*, 2013) y en el ganglio trigémino (mediante un mecanismo que se desconoce, pero se especula que es por migración nerviosa) (Santander, 2010). El periodo de latencia puede durar toda la vida económica del ave o puede interrumpirse cuando la inmunidad disminuye, ya sea debido a la edad del ave o a un episodio de estrés. Esta interrupción de la latencia para dar lugar a una infección activa, se conoce como “recrudescimiento” e involucra la reinfección de los epitelios respiratorios superiores (Bagust y Johnson, 1995) y la eliminación de virus al medio ambiente (Brooks *et al.*, 2002), pudiendo infectar a otras aves (Santander, 2010).

2.3.6. Supervivencia e inactivación del virus

Los herpesvirus son frágiles a las condiciones medioambientales y por lo tanto tienen poca capacidad de sobrevivir fuera de los animales infectados. En tráqueas de aves muertas el VLTII mantiene su actividad por 44 horas a temperaturas de 37°C y hasta por 30 días a temperaturas de 4 a 10°C (Santander, 2010). El virus sobrevive 3 a 20 días cuando se halla en las zonas profundas de la cama con temperaturas de 11 a 24.5°C y por lo menos tres días en las heces de las jaulas de baterías a temperaturas de 11 a 19.5°C (Dufour-Zavala, 2008).

El virus se inactiva rápidamente cuando los materiales contaminados se exponen a 55°C durante 15 minutos, o cuando se aplican soluciones con cresol al 3% por al menos 1 minuto. La

completa inactivación del VLTÍ se obtiene con peróxido de hidrógeno al 5% como fumígeno para el equipo de los galpones (Hidalgo, 2003).

2.3.7. Clasificación de las cepas

El virus de laringotraqueítis presenta un solo serotipo. Los estudios de protección cruzada, pruebas de neutralización e inmunofluorescencia indican que las cepas de VLTÍ son antigénicamente homogéneas (Guy y García, 2008).

Las cepas del VLTÍ se clasifican de acuerdo a su virulencia, así tenemos cepas de alta virulencia que clínicamente pueden causar enfermedad respiratoria severa con alta morbilidad y mortalidad, y cepas de baja virulencia que ocasionan infecciones respiratorias leves o inaparentes (Hidalgo, 2003; Chacón, 2005) con baja o ninguna mortalidad (García, 2013).

Las pruebas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en conjunción con polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en el gen TK del VLTÍ pueden ser aplicadas para diferenciar las cepas de alta y baja virulencia. Este método también sería adecuado para diferenciar las cepas vacunales vivas de las cepas de campo (Han y Kim, 2001).

2.4. EPIDEMIOLOGÍA

2.4.1. Incidencia y distribución geográfica de la laringotraqueítis infecciosa aviar

La enfermedad de laringotraqueítis infecciosa aviar ha sido identificado en muchos países y es una enfermedad severa cuando las poblaciones de aves de corral son susceptibles, especialmente en áreas de producción con alta densidad de aves como en: América del Norte, Sudamérica, Europa, China, Sudeste de Asia y Australia (Hidalgo, 2003).

2.4.2. Hospederos

Los pollos y las gallinas son los hospederos naturales de LTI, aunque la enfermedad afecta a todas las edades, los signos más característicos se observan en aves adultas (Hidalgo, 2003), sin embargo faisanes y pavos reales pueden ser infectados de manera natural a través del contacto con pollos (Bagust *et al.*, 2000). Se ha informado sobre la primera detección del VLTI en parvadas de pavos infectados naturalmente (Portz *et al.*, 2008).

Los estorninos, gorriones, cuervos, gaviotas, patos, palomas y gallinas de Guinea parecen ser refractarios al VLTI; sin embargo se ha logrado infectar experimentalmente a los patos originando enfermedad subclínica y seroconversión. Los huevos embrionados de pavos y pollos son susceptibles al VLTI, y en grado menor los huevos de pato, de gallina de Guinea y de palomas (Guy y García, 2008; Santander, 2010).

2.4.3. Transmisión

La transmisión del virus de LTI es horizontal (Guy y García, 2008), no habiéndose demostrado transmisión vertical (Rodríguez, 2007).

Las aves con infección clínica son las principales transmisoras del virus (Bagust y Johnson, 1995), sin embargo en brotes de los EE.UU. las aves con infecciones latentes también han transmitido el virus (Cover, 1996).

Las fallas en la bioseguridad (eliminación inapropiada de las aves muertas y heces, el intercambio de equipos entre las granjas, deficiente control de moscas, roedores, escarabajos y aves silvestres) pueden contribuir a la diseminación de la enfermedad dentro de la misma granja como a otras granjas (Kerr, 2010; Santander, 2010).

2.5. INMUNIDAD

Los anticuerpos maternos se transmiten a la progenie por medio del huevo, pero no protegen a la descendencia contra la infección ni interfieren con la vacunación (Brandão y Chacón, 2009).

La respuesta inmune por anticuerpos neutralizantes del virus se detecta en el suero dentro de los 5 a 7 días posteriores a la infección y se hallan en valores máximos alrededor de los 21 días. Esta respuesta inmune se mantiene en bajos niveles por un año o más (Hidalgo, 2003). Los anticuerpos pueden detectarse en las secreciones de la tráquea a partir de los 7 días post infección y su pico es alcanzado a los 10 a 28 días post infección (Santander, 2010). La secreción de anticuerpos incluidos la Ig A, son importantes para conferir resistencia a infección de las superficies mucosas, como las vías respiratorias (Hidalgo, 2003). Sin embargo la Ig A secretoria ni los anticuerpos neutralizantes no previenen totalmente la infección ni la enfermedad (Chacón, 2005).

Las respuestas de la inmunidad humoral al VLTI, aunque relacionadas con la infección, no son un mecanismo primario de protección, además por lo general se encuentra una baja correlación entre los títulos de anticuerpos séricos y el estado inmunitario de las parvadas. Siendo la respuesta inmunitaria mediada por células ubicadas en la tráquea, el principal mediador de la resistencia al VLTI, por ende conocida como la respuesta inmune protectora (Guy y García, 2008).

2.6. SIGNOS

Los signos clínicos de la enfermedad respiratoria ocurren entre los 6 a 12 días después de la exposición natural de la parvada, pero en condiciones experimentales mediante inoculaciones intratraqueales los signos clínicos aparecen entre los 2 a 4 días post inoculación (Fuchs *et al.*,

2007). Los signos clínicos reportados son: conjuntivitis, descarga nasal, estornudos, ronquera, disnea y depresión (Humberd *et al.*, 2002).

La presentación de los signos clínicos depende del tipo de cepa que afecta a las aves y del manejo durante la crianza (Santander, 2010).

Los signos clínicos asociados a formas leves de la enfermedad suelen ser inespecíficos, e incluyen a una leve traqueítis mucoide, sinusitis y conjuntivitis; algunas veces los signos pueden pasar desapercibidos por ser completamente suaves, las aves que enferman generalmente se recuperan pero quedan como portadoras. Con ello la enfermedad puede persistir por largos períodos con intermitentes excreciones del virus (OIE, 2008), pues el virus puede reactivarse espontáneamente y diseminarse cuando las aves se estresan, por ejemplo al inicio del periodo de postura o cuando se las instala en sus corrales (Ou y Giambrone, 2012).

Las formas severas de la enfermedad incluyen severa disnea con expectoración de moco sanguinolento (Humberd *et al.*, 2002) observándose salpicaduras de sangre en plumas y paredes, además puede manifestarse depresión y dificultad respiratoria acompañadas de extensiones del cuello (Linares *et al.*, 1994); generalmente la muerte es por asfixia (Abbas y Andreasen, 1996).

Las aves se recuperan de la enfermedad aproximadamente a los 7 ó 10 días desde que aparecen los signos clínicos (Bagust y Johnson, 1995).

2.7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad se basa tanto en el reconocimiento de signos clínicos como en la identificación de lesiones macroscópicas, pero además puede requerirse de una o más pruebas diagnósticas de laboratorio. Es importante el uso de estas pruebas, ya que otros patógenos respiratorios de las aves pueden originar signos clínicos y lesiones similares. Sólo en casos con

alta mortalidad de las aves y expectoración de sangre se puede diagnosticar la enfermedad en base a estos hallazgos (Bagust *et al.*, 2000; Guy y García, 2008).

Las pruebas de laboratorio tendrán como fin confirmar el diagnóstico de la enfermedad, ya sean mediante demostración de la presencia del virus, antígenos virales, detección de anticuerpos específicos en el suero o por el examen histopatológico de la tráquea para identificar cuerpos de inclusión (OIE, 2008). La mayoría de los laboratorios utilizan histopatología como primera opción (Bagust *et al.*, 2000).

La demostración de la presencia del virus o de sus antígenos se realiza mediante las pruebas como: aislamiento viral, microscopía electrónica, inmunofluorescencia, inmunodifusión en gel agar y PCR. De ellos los más sensibles corresponden a métodos moleculares como las pruebas de PCR y PCR de tiempo real que pueden ofrecer resultados concluyentes en espacio de 2 a 4 horas (Santander, 2010). La correlación de la detección molecular con la inmunofluorescencia o con la histopatología es de más del 90% (Salas, 2010).

La detección de anticuerpos se realizan mediante pruebas serológicas entre la que se tienen: neutralización viral, inmunofluorescencia indirecta, inmunodifusión en agar gel o enzimoimmunoensayo indirecto (Santander, 2010).

2.7.1. Serología

La prueba de enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecta tiene una sensibilidad similar a la inmunofluorescencia indirecta, y además su sensibilidad es superior a la neutralización viral (Hidalgo, 2003). La prueba menos sensible es la inmunodifusión en agar gel. Tanto la prueba de ELISA indirecta como la de inmunofluorescencia indirecta tienen las ventajas de rapidez y sensibilidad; sin embargo la ELISA indirecta carece de subjetividad inherente a la inmunofluorescencia indirecta y es más adecuada para probar grandes cantidades de sueros, de

otro lado la prueba de ELISA puede presentar resultados falsos positivos por ello el diagnóstico de la enfermedad de LTI no depende exclusivamente de la prueba de ELISA, además el título de anticuerpos no refleja y se correlaciona pobremente con el nivel de protección (Guy y García, 2008), solo nos sirve para orientarnos que el virus está presente en las muestras (Zavala, 2008; Salas, 2010), porque para la enfermedad de LTI la respuesta inmune mediada por células es la respuesta protectora (Fuchs *et al.*, 2007). Ello también se ha reportado en estudios realizados en aves bursectomizadas, las cuales se protegieron contra la reinfección viral aunque fueron incapaces de producir anticuerpos específicos (Guy y García, 2008).

2.7.2. Histopatología

Los cambios histopatológicos iniciales en la mucosa de la tráquea incluyen pérdida de células caliciformes e infiltración de células inflamatorias. Conforme la infección viral progresa las células epiteliales se hipertrofian, pierden cilios y el edema en la mucosa aumenta. A los 2 a 3 días post infección hay presencia de células multinucleadas (sincitios), así como migración hacia la mucosa y submucosa de linfocitos, histiocitos, y células plasmáticas. Posteriormente la destrucción y descamación celular provoca que la superficie de la mucosa esté cubierta por una delgada capa de células basales y algunas veces que exista pérdida completa de la cobertura epitelial; los vasos sanguíneos dentro de la lámina propia pueden protruir hacia el lumen de la tráquea. En casos de intensa destrucción y descamación celular puede desarrollarse hemorragia, debido a la exposición de los capilares sanguíneos (Hidalgo, 2003; Santander, 2010). La formación de sincitios de células epiteliales con presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares en el tejido epitelial de la conjuntiva y la tráquea resulta ser patognomónico de la enfermedad (Dufour-Zavala y Zavala, 2008). Los corpúsculos de inclusión intranucleares usualmente están presentes en fases tempranas de la infección (entre el 1er y 5to día post infección) y conforme progresa la infección como resultado de la necrosis y descamación de células epiteliales, los corpúsculos ya no son hallados (Humberd *et al.*, 2002); sin embargo en

formas leves de la enfermedad los corpúsculos de inclusión pueden no ser observados (Sellers *et al.*, 2004).

El análisis de hallazgos histopatológicos del VLTI a nivel de la tráquea se realiza con una tabla que involucra de cero a cinco grados de evaluación, la más completa y adecuada fueron realizadas por Guy *et al.* (1990), quienes elaboraron una tabla: criterios de evaluación para lesiones histopatológicas en tráqueas de pollos expuestos intratraquealmente al virus de LTI.

Los diagnósticos histopatológicos basados en la demostración de corpúsculos de inclusión son menos sensibles que el aislamiento viral. Algunos investigadores han demostrado en casos clínicos de la enfermedad la presencia de corpúsculos de inclusión en un 57%, mientras que el aislamiento viral obtuvo una sensibilidad de 72% (Guy y García, 2008).

2.7.3. Necropsia

Las lesiones macroscópicas observadas a menudo se ubican a nivel de tráquea, laringe y conjuntiva, y pueden ser de diferente grado, en los casos leves se halla solo excesiva cantidad de moco en tráquea; y en grados severos presencia de sangre, coágulos y placas diftéricas en tráquea o laringe (Linares *et al.*, 1994).

La cavidad abdominal generalmente está libre de lesiones durante la fase aguda, pero las complicaciones bacterianas pueden surgir días después del inicio de los signos clínicos, que resultan en la participación del sistema respiratorio bajo, que incluye a los sacos aéreos. En ausencia de complicaciones con bacterias secundarias, la LTI es básicamente una enfermedad del sistema respiratorio superior sin que participen los pulmones y sacos aéreos (Dufour-Zavala y Zavala, 2008).

2.8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La enfermedad respiratoria de LTI deberá ser diferenciada de otras enfermedades respiratorias, que ocasionen similares signos clínicos y lesiones. Entre estos se incluyen a la enfermedad de Newcastle, influenza aviar, bronquitis infecciosa aviar, difteroviruela, adenovirus, aspergilosis (Guy y García, 2008), micoplasmosis y cólera aviar (Rodríguez, 2007).

2.9. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

La bioseguridad y la vacunación son las dos medidas de prevención y control contra esta enfermedad (Rodríguez, 2007).

2.9.1. Bioseguridad

Para practicar la bioseguridad, es prioridad el control del brote activo de LTI y con ello prevenir la diseminación del virus de las granjas inicialmente afectadas a otros establecimientos de la zona o región. De ahí que lo primero que se realiza es el control de la enfermedad identificando los posibles brotes para su confirmación (Dufour-Zavala, 2008).

En los establecimientos avícolas con brotes de LTI se deberán implementar las siguientes medidas (Bagust *et al.*, 2000; Dufour-Zavala, 2008; Smith, 2008; Santander, 2010):

- Identificar los establecimientos avícolas o regiones geográficas en la que se hubiera confirmado la presencia del virus, con el fin de definir las zonas de vigilancia y control.
- Eliminar las aves muertas, los desechos (cama y guano) dentro del establecimiento diariamente, preferiblemente mediante composta. El compostado se debe realizar por al menos 7 días, y debe alcanzar una temperatura interna de 54 - 60°C y una humedad de 24 - 29%.

- Efectuar un riguroso control de moscas, roedores y escarabajos. El VLTI puede ser transmitido mecánicamente.
- Alambrar o enmallar los galpones para evitar el ingreso de aves silvestres.
- Limitar las visitas a lo esencial, para limitar la difusión del virus a otras granjas, hacer hincapié en la importancia de la atención continua a la bioseguridad y el mantenimiento de los libros de registro por el personal de producción.
- Las ruedas de los vehículos deben lavarse y desinfectarse al ingreso y egreso del establecimiento que se haya confirmado la presencia de LTI.
- La salida de aves de las granjas con brotes confirmados será permitida solo cuando su destino sea la faena, las mismas no deberán pasar cerca de otras granjas en crianza o en limpieza. El camión de transporte y las jaulas vacías se deben lavar y desinfectar en la planta de faena luego de la descarga de las aves.
- La cama usada se retirará por caminos lejanos a granjas en crianza o en limpieza y su destino serán las plantas de procesamiento de cama para someterlas a un proceso de pasteurización o centros de cultivos, ambos deberán estar alejados de instalaciones avícolas.
- Las instalaciones que alojaron aves infectadas con LTI deberán ser descontaminadas una vez que la granja se encuentre vacía. Se procederá a su limpieza completa con agua y detergente, seguida de la desinfección.
- El tiempo de descanso de la granja después que termine la saca, será de un mínimo de 30 días hasta un máximo de 91 días.

En caso que los programas estándares de bioseguridad no puedan detener el brote de LTI, se pueden aplicar los siguientes procedimientos además de los ya mencionados (Chin *et al.*, 2009):

- Luego de que se hayan enviado las aves a la faena, la cama usada por las aves enfermas será calentada al interior de los galpones a 37°C por 100 horas, luego el galpón se cuarentenará por 21 días (contados desde el día que culminó la saca en toda la granja), posteriormente la cama se retirará y enviará a centros de cultivo o plantas de procesamiento de cama, por caminos y hacia destinos alejados de instalaciones avícolas.
- Seguidamente se limpiarán y desinfectarán los galpones, y se colocará cama nueva para realizar un segundo calentamiento del galpón a 37°C por 100 horas.

2.9.2. Vacunas

2.9.2.1. Vacunas a virus vivo modificado

Existen dos tipos de vacunas a virus vivo modificado contra LTI, las cuales son vacunas vivas de origen en cultivo celular y vacunas vivas de origen en embrión de pollo, ambas se utilizan con éxito para la prevención de la enfermedad, sin embargo el virus de LTI puede permanecer en forma latente en las aves vacunadas con virus vivo y pueden causar brotes de LTI en condiciones de campo cuando se combina con factores predisponentes como pueden ser el estrés, co-infecciones con agentes patógenos respiratorios o inmunosupresivos, o una pobre ventilación (Santander, 2010). Las vacunas a virus vivo modificado de origen en embrión de pollo pueden revertir a virulencia después del pasaje por aves no vacunadas (Oldoni *et al.*, 2009). La reversión a la virulencia, hacia cepas más agresivas, ha sido involucrada en brotes de la enfermedad. A esta conclusión se llegó después de aislar el virus de un brote de LTI, el cual no pudo ser diferenciado molecularmente de las cepas vacunales y la reversión de las mismas hacia

formas patógenas era inminente, mientras que las vacunas a virus vivo modificado desarrolladas en cultivo celular son poco antigénicas (Guy y García, 2008).

Ante este inconveniente se han evaluado nuevas alternativas para la prevención de la enfermedad, como el uso de vacunas inactivadas y recombinantes, demostrándose en campo que no reversionan a virulencia (siendo consideradas como vacunas seguras) y no hacen latencia (Johnson *et al.*, 2010).

2.9.2.2. Vacunas recombinantes

Para la fabricación de vacunas recombinantes se requiere de un vector, por ejemplo un virus, que tenga un sitio intranuclear de multiplicación, gran genoma (para acomodar genes de otros patógenos) y un sistema único de enzimas y transcripciones virales que permitan la expresión de genes extraños de manera exacta, como es el caso de los virus de viruela aviar y de Marek (Tripathy y Reed, 2000). El cual al multiplicarse expresará el producto del segmento insertado. La vacunación con una vacuna recombinante resulta en una respuesta inmune contra el antígeno incluido en el vector y contra el vector mismo, sin necesidad de utilizar directamente al agente causal de la enfermedad (Moore, 2010; Malo, 2011).

El desarrollo de la inmunidad utilizando una vacuna recombinante va a depender de la replicación del vector. En el caso de vacunas recombinantes basadas en virus de replicación continua (como los herpesvirus) se elimina la necesidad de revacunar a las aves para obtener una protección prolongada (Malo, 2011). El herpesvirus del pavo (HVT) puede aislarse de pollos infectados durante periodos prolongados y sus anticuerpos persisten durante toda la vida de las aves (Schat y Nair, 2008).

La seropositividad al vector de algunas vacunas recombinantes debido a la exposición en el campo o la vacunación con virus vivo es importante de considerar porque impediría que el

vector se pueda replicar y por ende que no pueda otorgar inmunidad protectora, tal es el caso del virus vector de viruela aviar, por ello el uso de vacunas recombinantes de viruela aviar se limitará a la población seronegativa al virus vector (Swayne *et al.*, 2000). En cambio las vacunas recombinantes con el vector de HVT que se asocian a células son eficaces ante la presencia de anticuerpos contra su vector, siendo efectivas en presencia de anticuerpos maternos cuando se tiene el riesgo de una exposición temprana o cuando la progenitora transfiere gran cantidad de anticuerpos contra HVT a la progenie (Petrone *et al.*, 2000).

2.9.2.3. Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas son producidas basándose en microorganismos inactivados o muertos, para inactivar los microorganismos se requiere de sustancias o métodos que produzcan pocos cambios en los antígenos y que a la vez estimulen los mecanismos de inmunidad protectora (Tizard, 2009), la inactivación mantiene intactas las glicoproteínas pero al estar inactivados los microorganismos, requieren de adyuvantes (immunopotenciadores) que aumenten la eficiencia antigénica, como por ejemplo el aceite mineral. Las vacunas inactivadas contra la laringotraqueítis en emulsión oleosa, han sido probadas desde hace más de 20 años y en la mayoría de investigaciones se demuestra que la vacuna tiene resultados protectivos comparados con la vacuna viva en cultivo celular (Fernández, 2009).

En la mayoría de las vacunas inactivadas, las formulaciones en aceite mineral son eficaces. Los adyuvantes utilizados en estas vacunas pueden retener antígeno en el sitio de la inyección proporcionando un estímulo prolongado (Jansen *et al.*, 2005).

Las vacunas inactivadas especialmente las formuladas con aceite mineral, inducen altos niveles de IgY en el suero que pueden ser mantenidas por más de 1 año. Ya sea que se utilicen en animales previamente vacunados como no vacunados (Schijns *et al.*, 2008). Las vacunas inactivadas también inducen células T y respuestas inflamatorias en pollos, aunque ellas no son

tan eficientes en la inducción de la protección local como las vacunas vivas (Rautenschlein *et al.*, 2002), sin embargo se cree que la IgY puede ser trasudada hacia la superficie de las mucosas lo que sugeriría que las vacunas inactivadas pueden actuar localmente. Según los últimos hallazgos las vacunas inactivadas del virus de influenza aviar formuladas en un adyuvante de aceite mineral son capaces de limitar la secreción del virus tanto de las vías respiratorias como digestivas y han sido exitosamente usadas frente a brotes de influenza aviar (Swayne *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante los meses de julio y agosto del 2011, como se detalla a continuación:

- La crianza, vacunación y desafío experimental de las aves se llevó a cabo en los módulos de experimentación del Laboratorio de Patología Aviar.
- Las necropsias y las pruebas serológicas se realizaron en el Laboratorio de Patología Aviar.
- El examen histopatológico se ejecutó en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Animales

Se utilizaron un total de 288 pollos BB machos de un día de edad de la línea Ross 308, procedentes de un mismo lote de reproductoras.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral mínimo para el experimento se realizó a partir de la fórmula de tamaño muestral para la estimación de una diferencia de proporciones para muestras

independientes. Dicha fórmula está definida mediante la siguiente expresión matemática:

$$n = \frac{(Z_a + Z_B)^2 * (p_1q_1 + p_2q_2)^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

n : es el tamaño de muestra

p₁ : es la diferencia de proporción de enfermos en control

p₂ : es la proporción de enfermos vacunados

Z_a : nivel de significancia

Z_B : poder de la prueba

Para realizar el cálculo se tomó en consideración la morbilidad entre grupos experimentales. El cálculo se realizó en el programa estadístico STATA 10 para lo cual utilizamos los siguientes valores como referencia:

Test Ho: p₁ = p₂, donde p₁ es la proporción en la población 1 y
p₂ es la proporción en la población 2

Supuestos:

alfa = 0.0500 (doble cola)

potencia = 0.9000

p₁ = 1.0000

p₂ = 0.2000

n₂/n₁ = 1.00

Estimada de los tamaños de muestra necesarios:

n₁ = 8

n₂ = 8

Finalmente se realizó el estudio con un tamaño muestral de 72 aves por cada tratamiento, por lo cual se utilizaron un total de 288 aves.

3.3.2. Diseño experimental

Un total de 288 pollos BB machos fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de 72 pollitos con tres repeticiones de 24 animales por grupo. El estudio comprendió el seguimiento de parámetros de evaluación de las aves.

Las aves recibieron las siguientes vacunas:

Grupo A: Aves vacunadas con vacuna recombinante del virus de viruela aviar (DVA) que expresa el gen de la glicoproteína B del virus de LTI, aplicada al primer día de edad vía subcutánea.

Grupo B: Aves vacunadas simultáneamente con una vacuna inactivada emulsionada en aceite mineral vía subcutánea, más una vacuna recombinante del virus de viruela aviar que expresa el gen de la glicoproteína B del virus de LTI vía punción de la membrana alar, ambas aplicadas a los 14 días de edad.

Grupo C: Aves vacunadas con una vacuna recombinante de herpesvirus de pavo (HVT) asociado a células que expresa los genes de las glicoproteínas I y D del virus de LTI, aplicada al primer día de edad vía subcutánea.

Grupo D: Aves no vacunadas (control).

Además las aves fueron vacunadas en la planta de incubación contra los siguientes agentes:

- Enfermedad de Newcastle (cepa B1) y Bronquitis Infecciosa (cepa H120), por vía de aspersión.

- Enfermedad de Marek (cepa HVT) vía subcutánea. El grupo C no recibió esta vacuna en la planta de incubación, en su lugar recibió la vacuna recombinante de herpesvirus de pavo (HVT) asociado a células que expresa los genes de las glicoproteínas I y D del virus de LTI.

La alimentación se administró *ad libitum* con un concentrado conteniendo una fórmula comercial de acuerdo a la etapa de crianza.

Desafío viral

A los 35 días de edad todas las aves se desafiaron con 0.3 mL de un inóculo conteniendo un virus patógeno aislado de un brote de campo en aves de postura y con un título de 10^7 DIE₅₀. El desafío se realizó vía intratraqueal (0.2mL) y vía ocular (0.1mL).

3.4. PARÁMETROS EVALUADOS

3.4.1. Mortalidad

Se registró la mortalidad diaria por cada tratamiento hasta el término del estudio. Además se realizó la necropsia de las aves muertas en busca de hallazgos patológicos para determinar la causa de muerte.

3.4.2. Signos clínicos

Se evaluó individualmente la presentación de signos clínicos en forma diaria hasta los 14 días post desafío. Los signos clínicos evaluados fueron: signos respiratorios, conjuntivitis y depresión. El examen clínico individual de las aves de todos los grupos determinó el inicio, la presentación, la severidad y el desarrollo de signos clínicos post desafío.

Los signos clínicos fueron evaluados en base a intensidad o severidad, de acuerdo a los siguientes grados:

a. Signos clínicos

a.1 Signos respiratorios (adaptado de Devlin *et al.*, 2008)

Grado	Descripción
0	Sin signos de enfermedad respiratoria
1	Leve ronquera
2	Moderada ronquera
3	Severa ronquera

a.2 Signos de conjuntivitis (adaptado de Devlin *et al.*, 2006)

Grado	Descripción
0	Sin signos de conjuntivitis
1	Leve conjuntivitis
2	Severa conjuntivitis

a.3 Signos de depresión (Devlin *et al.*, 2006)

Grado	Descripción
0	Comportamiento aparentemente normal
1	Con ligera depresión
2	Con severa depresión

3.4.3. Lesiones macroscópicas

A los 5, 7, 9, 11 y 13 días post reto, se sacrificaron 5 aves por grupo, en busca de lesiones características en tráquea como mucosidad y hemorragias. Se utilizó un sistema de puntuación para graduar la severidad de patología (Devlin *et al.*, 2007).

Mucosidad en la tráquea

Grado	Descripción
0	Sin lesiones
1	Leve exudado mucoso traqueal
2	Moderado exudado mucoso traqueal
3	Severo exudado mucoso traqueal.
4	Muy severo exudado mucoso y hemorrágico traqueal

Hemorragia en tráquea

Grado	Descripción
0	Sin lesiones
1	Leve presencia petequeal en tráquea
2	Moderada presencia de petequias en tráquea
3	Severa presencia de petequias en tráquea
4	Muy severo, cuadro hemorrágico traqueal

3.4.4. Lesiones histopatológicas

A los 5, 7, 9, 11 y 13 días post desafío, se extrajo una muestra de tráquea de cada una de las 5 aves sacrificadas por cada tratamiento, las muestras se fijaron en formol al 10% para su evaluación histopatológica.

Las lesiones histopatológicas fueron graduadas desde 0 (sin lesiones) a 5 grados (lesiones muy severas) (Guy *et al.*, 1990).

Grado	Hallazgos histológicos
0	Normal: Delgado epitelio columnar pseudoestratificado. Glándulas mucosas normales.
1	Cambios mínimos: Epitelio normal con leve a moderada infiltración de linfocitos, raros o escasos heterófilos. Glándulas mucosas normales. Sin presencia de células sincitiales, ni células con cuerpos de inclusión intranucleares.
2	Cambios leves: Mucosa engrosada debido a leve a moderada infiltración celular y/o epitelio esencialmente normal excepto por focos de sincitios con cuerpos de inclusión intranucleares. Hiperemia, en ocasiones con manguitos celulares.
3	Cambios moderados: Mucosa engrosada debido a moderada a marcada infiltración celular. Numerosos sincitios con cuerpos de inclusión intranucleares. Focos de epitelio afectado o frecuentemente separado de o menos comúnmente exfoliados de la lámina propia. Superficie de la mucosa cubierta de epitelio normal o afectado. Glándulas de las mucosas reducidas. Marcada hiperemia, manguitos de células mononucleares alrededor de los vasos sanguíneos fuera de la mucosa.
4	Cambios severos: Mucosa engrosada debido a edema, fluido proteináceo, exudado celular o adherencias fibrinohemorrágicas a pseudomenbranas celulares sobre la superficie. Epitelio normal o ausente, superficie mucosa cubierta por una delgada capa de células basales. Sincitios con cuerpos de inclusión algunas veces presentes.
5	Cambios muy severos: Similar al grado 4, excepto que la mucosa no tiene epitelio residual y los sincitios con cuerpos de inclusión son raramente hallados.

3.4.5. Respuesta serológica

Se tomaron muestras de sangre a los 35 días de edad (previo al desafío) y a los 15 días post desafío, mediante la punción de la vena alar de 20 aves por grupo; para determinar la respuesta de anticuerpos por la prueba de ELISA indirecta usando el kit de Laboratorios Synbiotics.

3.4.6. Parámetros productivos

a. Peso corporal

El pesaje individual de las aves se realizó semanalmente desde el día de llegada (día cero), y luego a los días 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días de edad. Se utilizó una balanza digital de precisión.

b. Índice de conversión alimenticia (ICA)

Se evaluó semanalmente post desafío para cada tratamiento, el ICA se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$\text{ICA} = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Peso vivo}}$$

c. Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE)

Se evaluó para cada tratamiento al día 49 (14 días post desafío), mediante la siguiente expresión:

$$\text{IEPE} = \frac{\text{Viabilidad} \times \text{Peso vivo (Kg)} \times 100}{\text{Edad (días)} \times \text{ICA}}$$

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los datos se realizó aplicando el paquete estadístico STATA 10. Los signos clínicos (signos respiratorios, conjuntivitis, depresión), lesiones histopatológicas y macroscópicas, que presentaron de 0 a 3 grados como resultado de su evaluación, se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis para determinar diferencias entre los grados de cada tratamiento (grupos); en los grupos donde existió diferencia estadística significativa se realizó la prueba de Kruskal Wallis 2 para determinar qué grupo o grupos eran diferentes. Se realizó la prueba de Chi cuadrado para determinar la asociación entre los tratamientos y los grados cuando las variables presentaban hasta 3 grados (0,1 y 2) como resultado de su evaluación. Los resultados fueron analizados con un nivel de confianza del 95%.

La evaluación de los valores del peso corporal para cada uno de los animales entre los diferentes tratamientos (evaluado de forma individual para cada semana) fueron analizados mediante la prueba de Análisis de varianza (ANVA). Para ello asumimos que la variable sigue la distribución normal. La diferencia entre pesos para cada grupo experimental se realizó en función de $p < 0.05$. Las diferencias post-estimación fueron realizadas mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Bonferroni.

De igual forma se realizó el análisis de varianza (ANVA) para la evaluación del índice de conversión alimenticia (ICA) e índice de eficiencia productivo europeo (IEPE). Para ello, consideramos las repeticiones como unidades experimentales ($k=3$ repeticiones por grupo). El análisis post-estimación (en función de $p < 0.05$) se realizó mediante comparación múltiple de medias de Bonferroni.

IV. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD

El desafío con la cepa patógena del VLTi se realizó a los 35 días (5 semanas) de edad de las aves. Post desafío ningún ave de los grupos B, C y D evidenciaron lesiones características de LTI, las aves muertas mostraron buena condición, pero lesiones congestivas en hígado, bazo y riñones, además de leve edema pulmonar; sin embargo solo las aves del grupo D además de estas lesiones presentaron también material caseoso en pulmones y pleura. La mortalidad total acumulada al día 49 de edad (14vo día post reto) en el grupo A y B fue de 1.39 % y en el grupo C y D fue de 2.78 %. Los cuadros 1 y 2 muestran la mortalidad semanal acumulada y post desafío en los cuatro grupos.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad semanal acumulada hasta los 49 días de edad de las aves

Edad (días)	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	Número aves	%	Número aves	%	Número aves	%	Número aves	%
7	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	1.39	0	0	0	0	0	0
21	0	1.39	0	0	0	0	0	0
35(desafío)	0	1.39	0	0	0	0	0	0
42	0	1.39	1	1.39	0	0	0	0
49	0	1.39	0	1.39	2	2.78	2	2.78
Total	1	1.39	1	1.39	2	2.78	2	2.78

En el grupo A, la única ave que murió fue antes del desafío al ser golpeada por un comedero

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad post desafío hasta los 49 días de edad de las aves

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Aves desafiadas	71	72	72	72
Aves muertas	0	1	2	2
Porcentaje de mortalidad	0	1.39	2.78	2.78

4.2. EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos evaluados en todas las aves fueron: signos respiratorios, conjuntivitis, y depresión.

4.2.1. Evaluación de los signos respiratorios

La evaluación del grado promedio y cantidad de aves con sintomatología clínica respiratoria post desafío es presentada en el cuadro 3, 4 y figura 1. Previo al desafío las aves no mostraron signos clínicos, los signos fueron evaluados diariamente, siendo el principal signo clínico post desafío la ronquera, la cual se hizo evidente a partir del día 2 post desafío, el pico del grado promedio en signos respiratorios se manifestó al 4to día post desafío en todos los grupos evaluados (ver figura 1), siendo el grupo D el que presentó principalmente el mayor grado de signos respiratorios a lo largo del periodo de evaluación. Al día 14 post desafío los signos clínicos desaparecieron en todos los grupos. Los resultados del análisis de Chi cuadrado demostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en relación al grado de signos respiratorios entre

grupos experimentales al día 2 post desafío, en este día se halló que las aves del grupo D presentaron el mayor grado promedio en signos respiratorios comparado a los otros tres grupos y que las aves del grupo C manifestaron el menor grado promedio respecto de los grupos A, B y D. El día 6 post desafío mediante la prueba de Kruskal Wallis 2 las diferencias estadísticas significativas se detectaron entre los grupos A y D, B y D y entre los grupos C y D (mayor cantidad de signos respiratorios en los animales del grupo D o control comparado a los grupos vacunales A, B y C; $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en relación a la sintomatología respiratoria durante los días 4, 8, 10, 12 y 14 post desafío.

Cuadro 3. Grado de signos respiratorios post desafío*

	Días post desafío						
	2	4	6	8	10	12	14
Grupo A	0.44	1.45	0.51	0.25	0.02	0.00	0.00
Grupo B	0.46	1.60	0.73	0.45	0.16	0.04	0.00
Grupo C	0.36	1.57	0.52	0.51	0.31	0.07	0.00
Grupo D	0.68	1.65	1.32	0.68	0.25	0.00	0.00

*En promedio por grupo

Cuadro 4. Número de aves con signos respiratorios post desafío

	Días post desafío						
	2	4	6	8	10	12	14
Grupo A	30/71	70/71	28/61	14/56	1/51	0/46	0/41
Grupo B	32/72	71/72	34/62	18/56	8/51	2/46	0/41
Grupo C	25/72	71/72	26/62	23/57	10/52	2/46	0/41
Grupo D	45/72	72/72	53/62	29/57	10/52	0/45	0/40

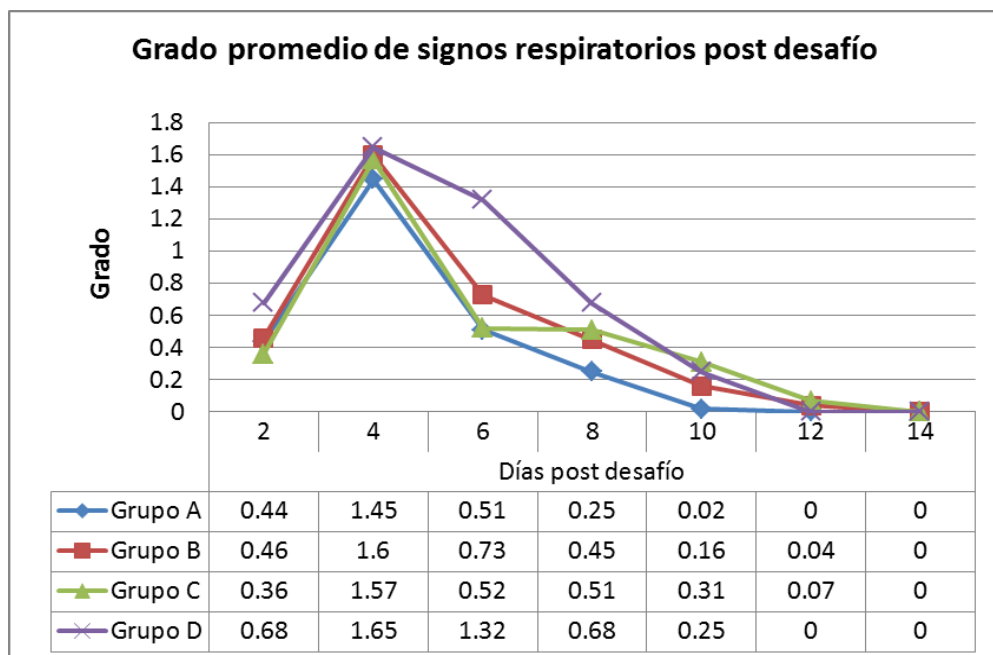


Figura 1. Grado promedio de signos respiratorios post desafío

4.2.2. Evaluación de la conjuntivitis

La conjuntivitis se presentó desde el día 2 post desafío, la mayor cantidad de aves con conjuntivitis se evidenció el día 4 post desafío. Los grados 0 y 1 fueron los que mayormente predominaron durante los días de evaluación, y los grado 1 y 2 se manifestaron principalmente en el grupo D. Los resultados del análisis de Chi cuadrado demostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en relación al grado de conjuntivitis entre tratamientos al día 6 y 8 post desafío, para estos días se hallaron que las aves del grupo D presentaron el mayor grado promedio de conjuntivitis que los demás grupos y que las aves del grupo C manifestaron el menor grado promedio respecto de los grupos A, B y D. No se detectaron diferencias estadísticas significativas los días 2, 4, 10, 12, 14 post desafío. La información descrita en detalle es presentada en el cuadro 5, 6 y figura 2.

Cuadro 5. Grado de conjuntivitis post desafío*

	Días post desafío						
	2	4	6	8	10	12	14
Grupo A	0.06	1.14	0.21	0.21	0.00	0.00	0.00
Grupo B	0.11	1.19	0.35	0.23	0.00	0.02	0.00
Grupo C	0.06	1.18	0.15	0.04	0.00	0.00	0.00
Grupo D	0.15	1.17	0.61	0.35	0.00	0.00	0.00

*En promedio por grupo

Cuadro 6. Número de aves con conjuntivitis post desafío

	Días post desafío						
	2	4	6	8	10	12	14
Grupo A	4/71	70/71	13/61	12/56	0/51	0/46	0/41
Grupo B	7/72	71/72	22/62	11/56	0/51	1/46	0/41
Grupo C	4/72	71/72	9/62	2/57	0/52	0/46	0/41
Grupo D	9/72	72/72	32/62	17/57	0/52	0/45	0/40

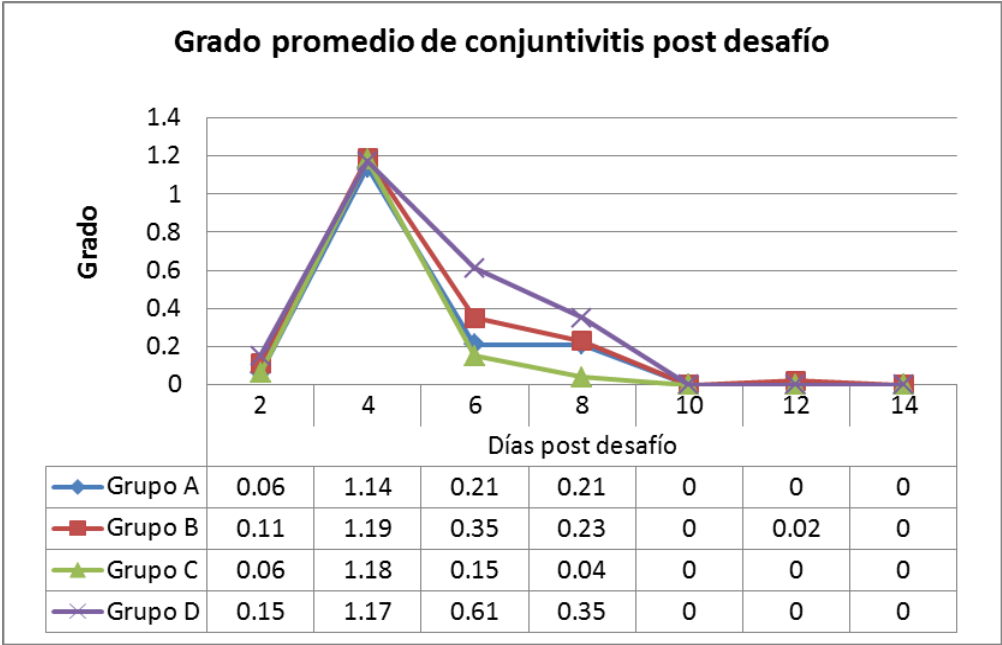


Figura 2. Grado promedio de conjuntivitis post desafío

4.2.3. Evaluación de la depresión

Solo las aves del grupo C y D mostraron depresión, sin embargo únicamente las aves del grupo D presentaron depresión de grado 2. La evaluación de la depresión no demostró diferencias estadísticas significativas durante el periodo de evaluación post desafío entre ninguno de los cuatro tratamientos (prueba de Chi cuadrado; $p>0.05$). La evaluación de la depresión es presentada en el cuadro 7 y 8.

Cuadro 7. Grado de depresión post desafío*

	Días post desafío						
	2	4	6	8	10	12	14
Grupo A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Grupo B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Grupo C	0.000	0.000	0.000	0.018	0.019	0.022	0.000
Grupo D	0.000	0.000	0.000	0.035	0.038	0.000	0.000

*En promedio por grupo

Cuadro 8. Número de aves con depresión post desafío

	Días post desafío						
	2	4	6	8	10	12	14
Grupo A	0/71	0/71	0/61	0/56	0/51	0/46	0/41
Grupo B	0/72	0/72	0/62	0/56	0/51	0/46	0/41
Grupo C	0/72	0/72	0/62	1/57	1/52	1/46	0/41
Grupo D	0/72	0/72	0/62	2/57	1/52	0/45	0/40

4.3. EVALUACIÓN DE LAS LESIONES MACROSCÓPICAS EN TRÁQUEA

La mayor severidad de lesiones macroscópicas (hemorragia petequiral, sangre y mucosidad en tráquea) fue observada principalmente en las aves del grupo D, sin embargo los resultados de la evaluación por día no demostraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$)

entre ninguno de los tratamientos. Los valores promedio de lesiones macroscópicas post desafío son presentados en el cuadro 9,10 y 11; mientras que en la figura 3 se muestran los grados de hemorragias petequiales.

Cuadro 9. Grado de hemorragias petequiales en tráquea post desafío*

	Días post desafío				
	5	7	9	11	13
Grupo A	0.6	1.2	0.4	1.2	0.6
Grupo B	0.6	1.0	0.2	1.0	0.2
Grupo C	0.4	1.0	0.2	0.8	0.6
Grupo D	1.8	1.8	0.8	1.4	0.4

*En promedio por grupo

Cuadro 10. Grado de sangre en lumen traqueal post desafío*

	Días post desafío				
	5	7	9	11	13
Grupo A	0.4	0.2	0.2	0.0	0.0
Grupo B	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0
Grupo C	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
Grupo D	0.6	0.6	0.2	0.4	0.0

*En promedio por grupo

Cuadro 11. Grado de mucosidad traqueal post desafío*

	Días post desafío				
	5	7	9	11	13
Grupo A	1.4	1.4	1.6	1.4	0.8
Grupo B	1.2	1.2	0.4	1.8	1.0
Grupo C	1.6	1.6	1.8	1.6	0.8
Grupo D	1.8	1.8	1.6	1.4	0.4

*En promedio por grupo

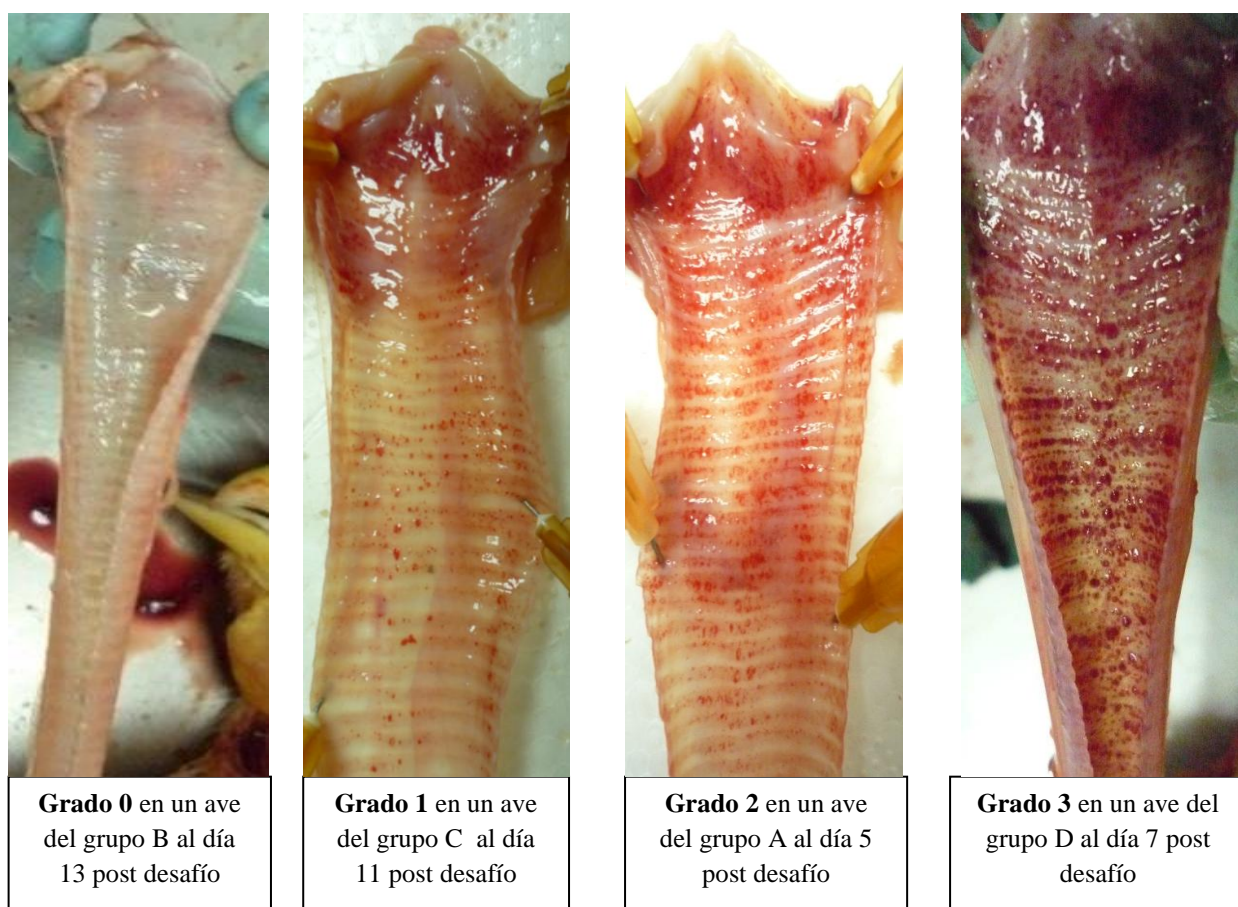


Figura 3. Hemorragias petequiales en tráqueas de los grupos A, B, C y D

4.4. EVALUACIÓN DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN TRÁQUEA

Los cuatro grupos de aves presentaron lesiones histopatológicas los días 5, 7, 9, 11 y 13 post desafío, siendo el grupo C el tratamiento de más pronta recuperación. Respecto a la infiltración mononuclear, esta se caracterizó por distribuirse de forma difusa (ver figura 5 A y 5 B); sin embargo en algunas tráqueas la infiltración no solo fue difusa, sino que presentaba también en algunas zonas distribución a manera de folículos, notándose que el grado 2 de lesión histopatológica presentaba folículos de menor tamaño a los hallados en la lesión de grado 3, incluso algunos folículos en lesiones de grado 3 (ver figura 5 C) llegaron a deformar la mucosa traqueal. De otro lado en ninguno de los días de evaluación se hallaron corpúsculos de inclusión

ni sincitios. El análisis de Chi cuadrado indicó diferencias significativas en relación al grado de lesiones histopatológicas entre tratamientos los días 9 y 11 post desafío ($p<0.05$), identificándose mayor grado promedio en los grupos B y D el día 9 post desafío y, en los grupos A y B el día 11 post desafío. En cambio los días 5, 7 y 13 post desafío no se detectaron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$). Los resultados de la evaluación histopatológica en las aves sacrificadas son presentados en el cuadro 12 y la figura 4.

Cuadro 12. Grado de lesiones histopatológicas en tráquea post desafío*

	Días post desafío				
	5	7	9	11	13
Grupo A	3.0	3.0	2.0	3.0	2.6
Grupo B	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0
Grupo C	3.0	3.0	2.2	2.0	2.0
Grupo D	3.0	3.0	3.0	2.4	2.4

*En promedio por grupo

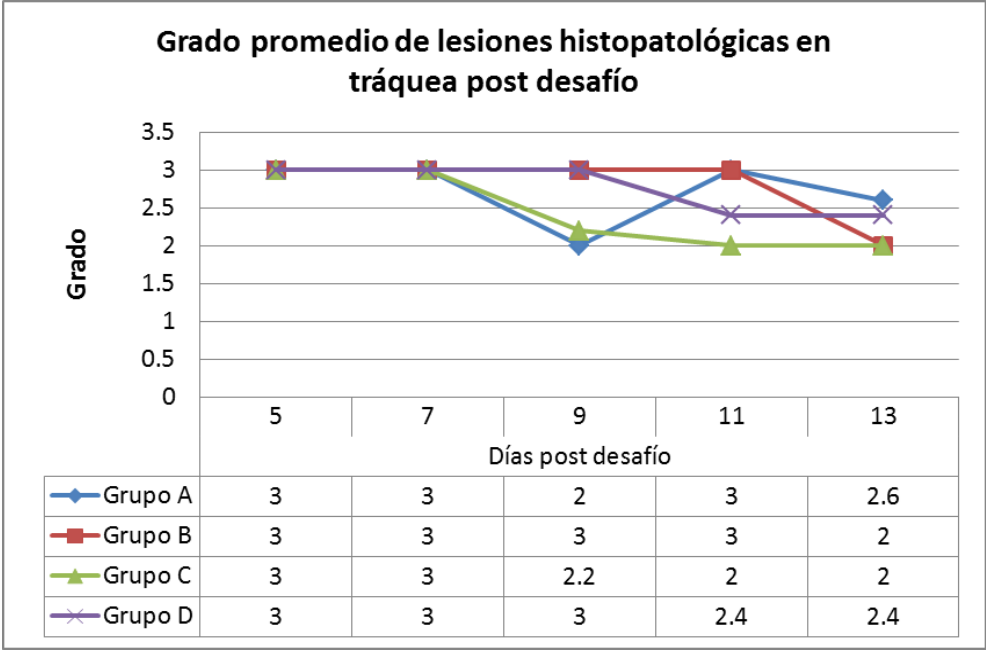
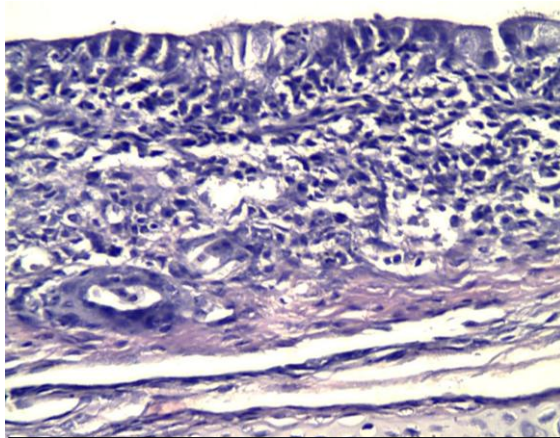
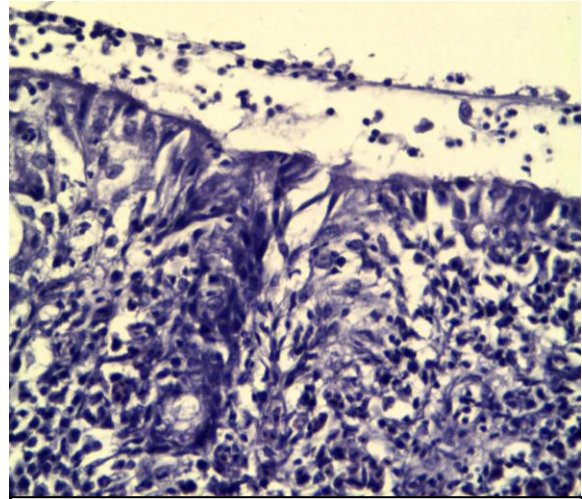


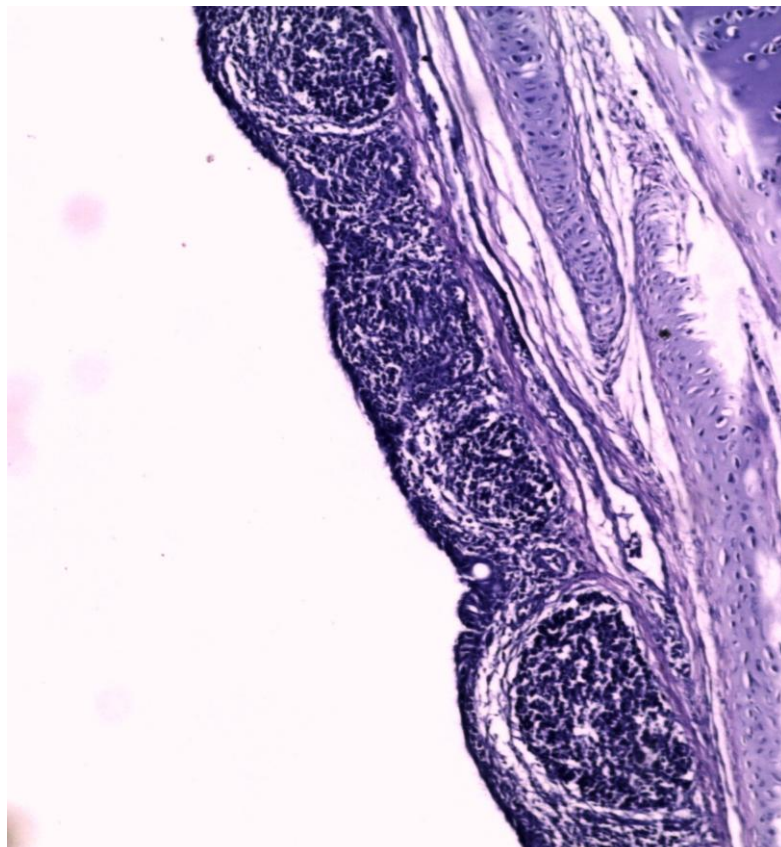
Figura 4. Grado promedio de lesiones histopatológicas en tráquea post desafío



A) Lesión de grado 2, pérdida progresiva de epitelio y cilios, moderado edema en la mucosa y leve infiltrado mononuclear (HE 100X)



B) Lesión de grado 3, se observa a la luz exudado mononuclear con moco y detritus, existe pérdida progresiva del epitelio (degeneración vacuolar a necrosis) además de modera infiltración mononuclear (HE 400X)



C) Lesión de grado 3, moderado engrosamiento de la mucosa por infiltración mononuclear y formación de folículos linfoides secundarios que la deforman (HE 40X)

Figura 5. Imágenes de lesiones histopatológicas traqueales de grado 2 y 3

4.5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA SEROLÓGICA

La respuesta serológica fue analizada antes (35 días de edad) y 15 días después del desafío (50 días de edad). Previo al desafío los promedios geométricos de títulos de anticuerpos fueron de bajo nivel en los cuatro grupos de aves, siendo más altos los títulos del grupo B (vacunado con la vacuna recombinante difteroviruela/laringotraqueítis más inactivada). A los 50 días de edad los grupos A y B presentaron una clara seroconversión con títulos de 2910 y 1960 de PAT respectivamente. Los resultados de la respuesta serológica (pre y post desafío) son presentados en el cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados serológicos de las aves antes del desafío (35 días de edad) y 15 días posteriores al desafío (50 días de edad)

Grupos	35 días (pre desafío)		50 días (15 días post desafío)	
	PAT	PGT	PAT	PGT
Grupo A	60	6	2910	2800
Grupo B	762	17	1960	600
Grupo C	0	0	217	10
Grupo D	58	2	490	124

4.6. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS

4.6.1. Evaluación del peso corporal

Los resultados del Análisis de varianza no demostraron diferencia estadística significativa ($p>0.05$) en relación al peso promedio semanal entre los tratamientos, ni antes ni después del desafío. Post desafío los valores del peso promedio y la ganancia de peso en el grupo C se mantuvieron superiores respecto de los grupos A, B y D; además se aprecia que el día en que se realizó el desafío (5 semanas) existían pesos superiores en las aves del grupo D. Sin embargo, a partir de las semanas post desafío el mejor peso promedio y ganancia de peso se observó en las aves con vacuna recombinante HVT/ LTI (Grupo C). Los resultados de los pesos (pre y post desafío) y de la ganancia de peso post desafío son presentados en el cuadro 14 y 15 respectivamente.

Cuadro 14. Peso corporal promedio (gramos) por semana

Peso promedio (gramos)				
Semana	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
1	166.08	162.78	162.75	162.43
2	404.03	397.06	400.67	397.90
3	765.16	771.54	771.64	769.96
4	1250.64	1255.07	1297.26	1257.65
5(desafío)	2005.22	2000.28	2020.83	2059.03
6	2669.71	2685.34	2734.04	2634.39
7	3592.64	3611.21	3663.99	3595.09

Cuadro 15. Ganancia de peso (gramos) post desafío

Ganancia de peso (gramos)*				
Semana	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
6	664.49	685.06	713.20	575.36
7	1587.42	1610.93	1643.16	1536.06

*La ganancia de peso se obtuvo de restar el peso a la semana 6 ó 7 del peso a la semana 5 (previo al desafío)

4.6.2. Evaluación del índice de conversión alimenticia (ICA)

Los valores promedio del ICA evaluados post desafío indicaron que el grupo C obtuvo el mejor ICA a la semana 6 y 7 de edad (7 y 14 días post desafío, respectivamente) en relación a los grupos A, B y D; sin embargo el análisis de varianza para cada semana (considerando las repeticiones o subgrupos dentro de cada tratamiento como unidades experimentales), no demostró diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre los grupos. Los resultados del ICA son presentados en el cuadro 16.

Cuadro 16. Índice de conversión alimenticia (ICA) post desafío

Índice de conversión alimenticia (ICA)				
Semana	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
6	2.85	2.73	2.56	3.11
7	2.50	2.43	2.36	2.53

4.6.3. Evaluación del índice de eficiencia productivo europeo (IEPE)

Los valores del IEPE a la semana 7 (14 días post desafío) se observaron superiores en el grupo C en relación a los grupos A, B y D. La prueba de ANVA (obtenido en función del valor de

IEPE para cada repetición dentro de los grupos experimentales) no demostró diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos (grupos). Los resultados del IEPE son presentados en el cuadro 17.

Cuadro 17. Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE) a los 14 días post desafío

IEPE	
Grupo A	455.93
Grupo B	471.84
Grupo C	493.30
Grupo D	430.61

V. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la protección vacunal conferida por dos tipos diferentes de vacunas recombinantes contra la LTI en pollos de engorde, usando la vacuna recombinante HVT/LTI y, la vacuna recombinante DVA/LTI, esta última aplicada ya sea sola o acompañada por una vacuna inactivada. Durante la evaluación de signos clínicos post desafío las aves de los cuatro grupos presentaron signos respiratorios y conjuntivitis, siendo las aves del grupo D (control) las que presentaron el mayor grado de signos respiratorios en comparación a las aves vacunadas ($p < 0.05$), dentro de los grupos vacunados las aves del grupo C mostraron una tendencia a tener menor grado de signos respiratorios y conjuntivitis. Posterior al desafío el principal signo clínico observado en las aves de nuestro ensayo fue la ronquera, signo que también ha sido descrito como importante en LTI por otros autores (Humberd *et al.*, 2002), la ronquera fue observada desde el 2do día post desafío, tal como ha sido descrito por otros autores (Fuchs *et al.*, 2007). Otro estudio desafiando con un virus patógeno de LTI a aves vacunadas, reportó disnea como signo predominante (Devlin *et al.*, 2008). Solo las aves de los grupos C y D mostraron depresión post desafío, siendo muy pocas aves afectadas con depresión severa, solo en el grupo D; sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre grupos en relación a esta variable.

Las más severas lesiones macroscópicas fueron observadas en las aves del grupo D, sin embargo no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre grupos. Aun cuando Devlin *et al.* (2007) describen lesiones macroscópicas consistentes en exudado mucoso y hemorrágico, debemos agregar que en nuestro estudio, durante la evaluación macroscópica algunas tráqueas presentaron no solo un exudado mucoso o hemorrágico en el lumen traqueal, sino también que se observaron hemorragias petequiales con o sin congestión.

La evaluación de lesiones histopatológicas realizada en las mismas aves en que se realizó la evaluación macroscópica determinó que los cuatro grupos presentaron lesiones de grado muy variable, evidenciándose diferencias significativas solo para los días 9 y 11 post desafío ($p < 0.05$), observándose mayor grado de lesiones en los grupos B y D al día 9 post desafío, y en los grupos A y B al día 11 post desafío. A los 11 días post reto el menor grado de lesiones fue observado en las aves del grupo C, además este grupo también presentó menor tamaño y cantidad de folículos linfoides secundarios, y mostró una tendencia hacia la recuperación más rápida respecto de los otros grupos, lo que nos indicaría que las lesiones histopatológicas en el grupo C (vacuna recombinante HVT/LTI) estarían más relacionadas a la inmunidad protectora vacunal que aparentemente impidió que la cepa de desafío replicara menos que en los otros grupos vacunales (A y B), reflejándose en mejores tendencias en sus parámetros productivos que los grupos A, B y D. Estudios similares reportaron que existe menor desarrollo de folículos linfoides secundarios en tráqueas con menor estímulo antigénico (Reese *et al.*, 2006) y que menores lesiones histopatológicas traqueales podrían estar asociadas a menores tasas de replicación del VLTI (Kirkpatrick *et al.*, 2006).

La mortalidad acumulada hasta los 14 días post desafío fue de 1.39% para el grupo B, 2.78% para el grupo C y 2.78% para el grupo D, sin embargo en ningún caso las lesiones observadas a la necropsia fueron características de la enfermedad, siendo compatibles con muerte súbita (muerte de aves en buena condición, con lesiones congestivas en hígado, riñones, bazo, y leve edema en pulmones); las aves muertas del grupo D (control) presentaron a la necropsia lesiones similares pero además se observó material caseoso en los pulmones y pleura, lo que indicaría que las aves de este grupo (control) presentaron complicaciones secundarias por *E.coli* como consecuencia del daño causado por el virus de desafío, tal como ha sido señalado por Bagust y Johnson (1995) quienes indican que el VLTI puede replicar en pulmones permitiendo infecciones secundarias por bacterias a ese nivel.

Estudios realizados anteriormente encontraron que los anticuerpos pueden ser detectados en las secreciones de la tráquea a partir de los 7 días post infección aproximadamente, haciendo una meseta a los 10 a 28 días de post infección, habiéndose observado que entre los 3 y 7 días post infección las aves infectadas de manera experimental incrementan sustancialmente la cantidad de células que sintetizan Ig A e Ig G en la tráquea (Santander, 2010). Respecto a los resultados serológicos de nuestro estudio a los 15 días post reto, las aves de los grupos A y B vacunadas con la vacuna recombinante en vector DVA mostraron los más altos títulos de anticuerpos por la prueba de ELISA, habiéndose obtenido un PAT de 2910 y 1960 para los grupos A y B respectivamente, de otro lado las aves del grupo D (control) mostraron una débil respuesta inmune activa post desafío, con valores de PAT de 490, y las aves del grupo C, vacunadas con la vacuna recombinante en vector HVT fueron negativas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tong *et al.* (2001) quienes detectaron una respuesta de anticuerpos por la prueba de ELISA en aves vacunadas con una vacuna recombinante DVA/LTI similar a la de nuestro estudio. Los resultados de este estudio demuestran que la vacuna recombinante contra laringotraqueítis que tiene como vector al virus de la difteroviruela aviar induce una respuesta de anticuerpos detectable por la prueba de ELISA; de otro lado se demuestra también lenta seroconversión de pollos de engorde después de un reto experimental.

En lo que respecta a los parámetros productivos los resultados no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) durante ninguna semana de evaluación pre (pesos) y post desafío (pesos, ICA e IEPE) entre tratamientos, sin embargo la evaluación post desafío mostró que las aves del grupo C (vacuna recombinante HVT/LTI) mostraron una tendencia a mejores parámetros productivos respecto de los grupos A, B y D. Indicando que las aves del grupo C fueron más eficientes en transformar el alimento en carne en comparación a los otros grupos del experimento. Probablemente la tendencia de las aves del grupo C a manifestar menor grado de signos clínicos respiratorios y conjuntivitis se vio reflejada en mejores parámetros productivos.

Se ha señalado que una posible razón por la que las vacunas recombinantes de DVA/LTI no inducen muy buena protección contra LTI, es la presencia de anticuerpos maternos en pollos muy jóvenes que proceden de reproductoras vacunadas contra DVA como parte de su programa de vacunación habitual (Vagnozzi *et al.*, 2012). Las aves de los grupos A y B de nuestro estudio que tuvieron una menor protección contra la enfermedad en comparación a las aves del grupo C, fueron vacunadas al día 1 (grupo A) y día 14 (grupo B) con la vacuna recombinante DVA/LTI. Estudios similares indican que la vacuna recombinante de DVA/LTI genera adecuada protección en aves reproductoras ligeras, cuando la vacuna se administra a la semana 10 de edad y el reto ocurre entre la semana 20 a 45 post vacunación, dando a entender que la vacuna induce adecuada protección cuando ésta se aplica a una edad (10 semanas) en la que probablemente los anticuerpos maternos contra el virus de viruela han desaparecido o son de muy bajo nivel, y que el vector de la vacuna recombinante de viruela alcanza adecuada protección al cabo de varias semanas antes que ocurra el desafío (Higuera *et al.*, 2011).

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente estudio permiten concluir que la mejor protección contra la laringotraqueítis infecciosa frente a un alto desafío con una cepa patógena (10^7 DIE₅₀), fue obtenida por la vacuna recombinante HVT/LTI aplicada al primer día de edad.
- Se obtuvo una menor protección contra la enfermedad con la vacuna recombinante DVA/LTI, aplicada con y sin una vacuna inactivada, esto posiblemente asociado a una interferencia vacunal ejercida por los anticuerpos maternos contra el virus de la DVA.
- Al final del estudio (50 días de edad), la vacuna recombinante DVA/LTI indujo una respuesta de anticuerpos detectable por la prueba de ELISA, mientras que la vacuna recombinante HVT/LTI no.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abbas F, Andreasen JR Jr. 1996. Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. *Avian Dis* 40: 290-295.
2. Alvarado J. 2010. Impacto económico de laringotraqueítis infecciosa en una granja de ponedoras en el departamento de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2 p.
3. Bagust TJ, Johnson MA. 1995. Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathol* 24: 373-391.
4. Bagust TJ, Jones RC, Guy JS. 2000. Avian infectious laryngotracheitis. *Rev Sci Tech* 19: 483-492.
5. Blacker HP, Kirkpatrick NC, Rubite A, O'Rourke D, Noormohammadi AH. 2011. Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. *Aust Vet J* 89: 89-94.
6. Brandão PE, Chacón JL. 2009. Laringotraqueíte infecciosa. In: Revolledo L, Ferreira AJP, eds. *Patologia aviária*. Brasil: Manole. p 276-281.
7. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2002. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17^a ed. México: Manual Moderno. p 461-485.
8. Chacón J. 2005. Vírus da laringotraqueíte infecciosa: detecção e caracterização molecular, isolamento, diagnóstico diferencial e epidemiologia de um surto em granjas de poedeiras comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo. 32 - 45p.

9. Chang PC, Chen KT, Shien JH, Shieh HK. 2002. Expression of infectious laryngotracheitis virus glycoproteins in *Escherichia coli* and their application in enzyme-linked immunosorbent Assay. Avian Dis 46: 570–580.
10. Chin R, García M, Corsiglia C, Riblet S, Crespo R, Shivaprasad H, Rodríguez-Avila A, Woolcock P, França M. 2009. Intervention strategies for laryngotracheitis: impact of extended downtime and enhanced biosecurity auditing. Avian Dis 53: 574 - 577.
11. Coppo MJ, Hartley CA, Devlin JM. 2013. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. Dev Comp Immunol 41: 454 - 462.
12. Cover MS. 1996. The early history of infectious laryngotracheitis. Avian Dis 40: 494-500.
13. Devlin JM, Browning GF, Hartley CA, Kirkpatrick NC, Mahmoudian A, Noormohammadi AH, Gilkerson JR. 2006. Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. J Gen Virol 87: 2839–2847.
14. Devlin JM, Browning GF, Hartley CA, Gilkerson JR. 2007. Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine. Vaccine 25: 3561–3566.
15. Devlin JM, Browning GF, Gilkerson JR, Fenton SP, Hartley CA. 2008. Comparison of the safety and protective efficacy of vaccination with glycoprotein-G-deficient infectious laryngotracheitis virus delivered via eye-drop, drinking water or aerosol. Avian Pathol 37: 83-88.
16. Dufour-Zavala L. 2008. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. Avian Dis 52: 1–7.

17. Dufour-Zavala L, Zavala G. 2008. Control de la laringotraqueítis vacunal. Actualidad Avipecuaria 11: 14-16.
18. Fernández M. 2009. Uso de vacunas oleosas contra la laringotraqueítis infecciosa. Farvet al día 2: 6-9.
19. Fuchs W, Veits J, Helferich D, Granzow H, Teifke JP, Mettenleiter TC. 2007. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. Vet Res 38: 261-279.
20. García M. 2013. Overview of infectious laryngotracheitis in poultry. [Internet], [September 21st, 2013]. Available in: http://www.merckmanuals.com/vet/poultry/infectious_laryngotracheitis/overview_of_infectious_laryngotracheitis_in_poultry.html
21. Gibert M. 2010. Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. p 10.
22. Guy JS, Barnes HJ, Morgan LM. 1990. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. Avian Dis 34:106-113.
23. Guy JS, García M. 2008. Laryngotracheitis. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, Mc Dougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds. Diseases of poultry. 12th ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing. p 137-152.
24. Han GM, Kim SJ. 2001. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. Vet Microbiol 83: 321-331.

25. Hidalgo H. 2003. Infectious Laryngotracheitis: A review. *Brazilian J Poult Sci* 5: 157-168.
26. Higuera S, Lechuga M, Mercado G. 2011. Estudio para la valoración de la protección generada a diferentes edades con una vacuna vectorizada contra el virus de la laringotraqueítis infecciosa en gallinas criadas en granja y desafiadas en laboratorio. [Internet], [4 setiembre 2013]. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/vacuna-vectorizada-t3544/165-p0.htm>
27. Humbert J, García M, Riblet SM, Resurreccion RS, Brown TP. 2002. Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis* 46:64-74.
28. Jansen T, Hofmans MP, Theelen MJ, Schijns VE. 2005. Structure–activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. *Vaccine* 23:1053–1060.
29. Johnson DI, Vagnozzi A, Dorea F, Riblet SM, Mundt A, Zavala G, García M. 2010. Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially available viral vector recombinant vaccines. *Avian Dis* 54:1251-1259.
30. Kerr F. 2010. Infectious laryngotracheitis in broilers. [Internet], [November 5th, 2013]. Available in: <http://www.vet.unimelb.edu.au/docs/Essay2010-FelicityKerr.pdf>
31. Kirkpatrick NC, Mahmoudian A, Colson CA, Devlin JM, Noormohammadi AH. 2006. Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol* 35: 449-453.
32. Linares JA, Bickford AA, Cooper GL, Charlton BR, Woolcock PR. 1994. An outbreak of infectious laryngotracheitis in California broilers. *Avian Dis* 38:188-192.

33. Malo A. 2011. Nuevas alternativas para el control de la laringotraqueítis infecciosa de las aves. [Internet], [23 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/foros/nuevas-alternativas-control-laringotraqueítis-t21062/165-p0.htm>
34. Moore K. 2010. Tecnología y elaboración de vacunas vectorizadas. [Internet], [24 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.elsitioavicola.com/articles/1947/tecnologia-y-elaboracion-de-vacunas-vectorizadas>
35. Negrete M. 2008. Laringotraqueítis infecciosa: la experiencia peruana. [Internet], [18 enero 2012]. Disponible en: <http://www.amevea-ecuador.org/datos/LARINGOTRAQUEÍTIS%20INFECCIOSA%20LA%20EXPERIENCIA%20PERUANA.pdf>
36. OIE. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres. [Internet], [12 octubre 2013]. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.03.%20Laringotraque%C3%ADtis%20infecciosa%20aviar.pdf
37. OIE. 2013. Enfermedades de la lista de la OIE. [Internet], [19 julio 2013]. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2013/>
38. Oldoni I, Rodríguez-Avila A, Riblet SM, Zavala G, García M. 2009. Pathogenicity and growth characteristics of selected infectious laryngotracheitis virus strains from the United States. *Avian Pathol* 38: 47-53.
39. Ou SC, Giambrone JJ. 2012. Infectious laryngotracheitis virus in chickens. *World J Virol* 1: 142-149.

40. Petrone V, Hernández X, Téllez G. 2000. Enfermedad de Marek. [Internet], [26 setiembre 2013]. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-04/RVM31410.pdf>
41. Portz C, Beltrão N, Furian TQ, Júnior AB, Macagnan M, Griebeler J, Lima Rosa CA, Colodel EM, Driemeier D, Back A, Barth Schatzmayr OM, Canal CW. 2008. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Vet Microbiol* 131: 57-64.
42. Rautenschlein S, Yeh HY, Njenga MK, Sharma JM. 2002. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol* 147: 285–304.
43. Reese S, Dalamani G, Kaspers B. 2006. The avian lung-associated immune system: a review. *Vet Res* 37: 311–324.
44. Rodriguez A. 2007. Replication, transmission, and protection of live-attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccines. Master of Science Thesis. Georgia: University of Georgia. 7-18 p.
45. Salas M. 2010. Método de diagnóstico para laringotraqueítis infecciosa aviar. Sistema de revisiones en investigación Veterinaria de San Marcos. [Internet], [16 diciembre 2011]. Disponible en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_salas_Final.pdf
46. Santander MJ. 2010. Manual para la atención de focos de laringotraqueítis infecciosa aviar en zona suroccidental del valle del Cauca. [Internet], [03 julio 2011]. Disponible en: <http://www.solla.com/PDF/manual-para-manejo-de-focos-de-la-laringotraqueítis.pdf>
47. Schat KA, Nair V. 2008. Marek's Disease. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, Mc Dougald LR, Nolan LK, Swayne DE, eds. *Diseases of poultry*. 12th ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing. 452-492 p.

48. Schijns V, Sharma J, Tarpey I. 2008. Practical aspects of poultry vaccination. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA, eds. *Avian Immunology*. London, UK: Elsevier. 380 p.
49. Sellers HS, García M, Glisson JR, Brown TP, Sander JS, Guy JS. 2004. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian Dis* 48: 430-436.
50. SENASA. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2008. Laringotraqueítis en el Perú. *Actualidad Avipecuaria* 11: 50-51.
51. Smith JA. 2008. Update on laryngotracheitis epidemiology and control methods. [Internet], [January 25th, 2012]. Available in: <http://www.thepoultrysite.com/articles/1119/update-on-laryngotracheitis-epidemiology-and-control-methods>
52. Swayne DE, Beck JR, Kinney N. 2000. Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis* 44: 132–137.
53. Swayne D, Lee C, Spackman E. 2006. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol* 35: 141–146.
54. Tizard I. 2009. *Introducción a la inmunología veterinaria*. 8^a ed. España: Elsevier Saunders. 259 p.
55. Tong GZ, Zhang SJ, Wang L, Qiu HJ, Wang YF, Wang M. 2001. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol* 30: 143 - 148.

56. Tripathy DN, Reed WM. 2000. Viruela Aviar. En: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, eds. Enfermedades de las aves. 2ª ed. México: Manual moderno. p 659-671.
57. Vagnozzi A, Zavala G, Riblet SM, Mundt A, García M. 2012. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. Avian Pathol 41: 21-31.
58. Yauris G. 2005. Evidencia serológica de anticuerpos contra el virus de la laringotraqueítis Infecciosa Aviar en gallinas reproductoras de carne y postura. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 52 p.
59. Zavala G. 2008. Actualización en laringotraqueítis infecciosa. [Internet], [20 junio 2013]. Disponible en: <http://ebookbrowse.com/actualizacion-en-laringotraqueitis-zavala-2008-word-2003-doc-d160998397>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Hemorragias petequiales en tráquea post desafío

		PETEQUIAS EN TRÁQUEA				
		DIA 5	DIA 7	DIA 9	DIA 11	DIA 13
GRUPO A		1	1	1	1	1
		2	1	0	2	0
		0	1	0	1	0
		0	3	1	1	1
		0	0	0	1	1
promedio		0.6	1.2	0.4	1.2	0.6
Grupo B		1	1	1	1	0
		1	3	0	2	0
		1	1	0	1	0
		0	0	0	0	1
		0	0	0	1	0
promedio		0.6	1	0.2	1	0.2
GRUPO C		1	2	0	1	0
		1	1	0	0	0
		0	0	0	1	1
		0	1	1	1	1
		0	1	0	1	1
promedio		0.4	1	0.2	0.8	0.6
Grupo D		1	1	0	1	0
		2	2	1	1	0
		2	3	2	1	0
		3	3	1	2	1
		1	0	0	2	1
promedio		1.8	1.8	0.8	1.4	0.4

Anexo 2. Lesiones histopatológicas en tráquea post desafío

	DIA 5	DIA 7	DIA 9	DIA 11	DIA 13
GRUPO A	3	3	2	3	2
	3	3	2	3	2
	3	3	2	3	3
	3	3	2	3	3
	3	3	2	3	3
promedio	3	3	2	3	2.6
GRUPO B	3	3	3	3	2
	3	3	3	3	2
	3	3	3	3	2
	3	3	3	3	2
	3	3	3	3	2
promedio	3	3	3	3	2
GRUPO C	3	3	2	2	2
	3	3	2	2	2
	3	3	3	2	2
	3	3	2	2	2
	3	3	2	2	2
promedio	3	3	2.2	2	2
GRUPO D	3	3	3	2	2
	3	3	3	2	2
	3	3	3	2	2
	3	3	3	3	3
	3	3	3	3	3
promedio	3	3	3	2.4	2.4